

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Lenka Strnadová

Vliv modulátorů NMDA receptorů na buněčnou smrt v modelech excitotoxicity in vitro.
Effects of NMDA receptor modulators on cell death in models of excitotoxicity in vitro.

Bakalářská práce

Školitel:
Tereza Smejkalová, Ph.D.

Praha, 2019

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat své školitelce Tereze Smejkalové, Ph.D. za odborné vedení a trpělivou pomoc při zpracovávání této práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za jejich podporu nejen v průběhu psaní této práce, ale i po čas celého studia na vysoké škole.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 7. 5. 2019

Podpis

Abstrakt

NMDA receptory jsou ionotropní glutamátové receptory (iGluR) aktivované aminokyselinou glutamátem a zprostředkovávající přenos signálu v centrální nervové soustavě. Jejich správná aktivita je důležitá pro synaptogenezi, neuronální plasticitu a synaptickou transmissi. Při nadměrné aktivaci NMDAR ale dochází k silnému vtoku vápníku dovnitř neuronů, který v buňkách způsobuje řadu destruktivních efektů končících buněčnou smrtí. Tato tzv. buněčná excitotoxicita se vyskytuje jak při mnohých neurodegenerativních onemocněních, jako je Alzheimerova choroba či Parkinsonova choroba, tak i při akutních patofyziologických stavech, jako je mrtvice či traumatické poranění mozku. Obecné inhibitory NMDAR, které by excitotoxicitě byly schopny zabránit, se často v *in vivo* modelech projevují negativními vedlejšími účinky. Naopak selektivní inhibitory, které by nežádoucí aktivitu NMDAR blokovaly a zároveň by zachovaly jejich fyziologickou funkci se jeví jako terapeuticky využitelné. Tato práce stručně shrne poznatky o struktuře, aktivaci a lokalizaci NMDA receptorů, dále pak nastíní jejich podíl v buněčné excitotoxicitě a metody, jak akutní excitotoxicitu můžeme zkoumat v *in vitro* modelech, a nakonec srovná účinky několika známých NMDAR inhibitorů a jejich případné klinické použití.

Klíčová slova: NMDA receptor, excitotoxicita, glutamát, neurodegenerace, OGD, inhibitor, memantin, pregnanolon sulfát, MK-801

Abstract

NMDA receptors are ionotropic glutamate receptors (iGluR) activated by the amino acid glutamate and mediating signal transmission in the central nervous system. Their proper activity is essential for synaptogenesis, neuronal plasticity and synaptic transmission. However, excessive activation of NMDAR causes strong influx of calcium ions into neurons which triggers several destructive effects, eventually ending with cell death. This so-called excitotoxicity is present not only in many neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease or Parkinson's disease, but also in acute pathophysiological conditions, such as stroke or traumatic brain injury. General NMDAR inhibitors that could potentially prevent neuronal excitotoxicity have shown severe negative side effects in models *in vivo*. On the other hand, selective inhibitors of NMDA receptors with the ability to block the unwanted excessive activity while preserving NMDAR physiological function have shown to be therapeutically useful. This work is going to briefly summarize the knowledge of structure, activation and localization of NMDA receptors, then it is going to describe their role in mediating neuronal toxicity and a few methods we can use to study excitotoxicity *in vitro*. Finally, this work will compare the effects of several known NMDAR inhibitors and their possible use in the clinical context.

Keywords: NMDA receptor, excitotoxicity, glutamate, neurodegeneration, OGD, inhibitor, memantine, pregnanolone sulphate, MK-801

Seznam zkratek

NMDA	N-methyl-D-aspartát
iGluR	ionotropní glutamátový receptor
CNS	centrální nervová soustava
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionát
NMDAR	NMDA receptor
PCP	fencyklidin
ATD	amino-terminal domain
LBD	ligand-binding domain
TMD	transmembrane domain
CTD	carboxyl-terminal domain
LDH	laktátdehydrogenáza
GLT-1	glutamate transporter 1
TBOA	DL- <i>threo</i> - β -benzyloxyaspartát
MK-801	dizocilpin
CREB	cAMP response element binding protein
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
ROS	reactive oxygen species
OGD	oxygen-glucose deprivation
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
LTP	long-term potentiation
HEK293	Human Embryonic Kidney cell
EPSC	excitatory postsynaptic current
PA-S	pregnanolon sulfát
PA-hPim	pregnanolon hemipimelát
PREG-S	pregnenolon sulfát
24(S)-HC	24(S)-hydroxycholesterol
PAM	pozitivní alosterický modulátor
4-AP	4-aminopyridin

Obsah

1. Úvod.....	7
2. NMDA receptory a jejich funkce v CNS	9
2.1. Aktivace NMDAR.....	9
2.2. Struktura NMDAR a jejich podjednotky.....	10
2.3. Lokalizace NMDAR v CNS	12
3. Excitotoxicita NMDA receptorů	14
3.1. Původ zvýšené koncentrace glutamátu.....	14
3.2. Protichůdné účinky aktivity NMDAR.....	15
3.3. Akutní excitotoxicita NMDAR a metody jejího zkoumání.....	16
4. Modulátory aktivity NMDA receptorů	18
4.1. Blokátory iontového kanálu.....	19
4.1.1. MK-801	19
4.1.2. Memantin	21
4.2. Inhibiční steroidy	23
4.3. Pozitivní modulátory aktivity NMDAR	25
5. Přístupy ke studiu NMDAR toxicity.....	26
6. Závěr	29

1. Úvod

NMDA (N-methyl-D-aspartát) receptory jsou jedním z typů ionotropních glutamátových receptorů (iGluR) vyskytujících se v centrálním nervovém systému (CNS) a fungujících jako ligandem ovládané iontové kanály (Hansen et al., 2018). Spolu s dalšími subtypy iGluR receptorů, kterými jsou AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionát) receptory a kainátové receptory, zajišťují excitační přenos signálu spouštěného presynaptickým uvolňováním neurotransmiteru glutamátu do synaptické štěrby (Hansen et al., 2018; Vyklícký et al., 2014). Pro NMDA receptor (NMDAR) je charakteristické, že v klidovém stavu je jeho kanál blokován Mg^{2+} iontem (Nowak, Bregestovski, Ascher, Herbert, & Prochiantz, 1984). Při synaptické transmissi signálu, kdy dochází k depolarizaci postsynaptického neuronu především díky rychlé aktivaci AMPA receptorů (Hansen et al., 2018), je tento Mg^{2+} blok následně odstraněn a NMDA receptory se stávají propustnější pro ionty sodíku, draslíku a vápníku (MacDermott, Mayer, Westbrook, Smith, & Barker, 1986). Činnost NMDAR je esenciální pro správnou funkci a plasticitu CNS a vlastní přežití neuronů, jak bylo shrnuto v (Hardingham & Bading, 2010). Nedostatečná, ale zároveň i nadměrná aktivace NMDA receptorů má v organismu neuropatologické důsledky (Paoletti, Bellone, & Zhou, 2013).

Dysfunkce NMDA receptorů je spojena s různými závažnými patofyziologickými stavy a onemocněními CNS. Mezi akutní symptomy hypofunkce NMDAR patří např. halucinace, paranoia a kognitivní deficity, jako je ztráta paměti. Blokace NMDA receptorů inhibitory, jakými jsou např. ketamin a PCP (fencyklidin), má za následek podobné nežádoucí účinky (Bal, 2016; Krystal et al., 1994; Javitt & Zukin, 1991). Dlouhodobě snížená funkce NMDAR, způsobená mimo jiné mutacemi v genech kódujících podjednotky NMDAR, je jednou z možných příčin onemocnění a poruch vznikajících během vývoje nervové soustavy (Paoletti et al., 2013), mezi nimiž jsou poruchy autistického spektra, mentální retardace a schizofrenie (Berkel et al., 2010; Endeley et al., 2010; Gao et al., 2000; Ibrahim et al., 2000). V případě léčby poruch spojených s hypofunkcí NMDA receptorů by tedy mohla mít klinické využití pozitivní modulace (potenciace) NMDAR za účelem kompenzace jejich nízké aktivity.

Na druhou stranu nadměrná aktivace NMDAR excitační aminokyselinou glutamátem a následný vtok Ca^{2+} iontů dovnitř neuronů je ale již po dlouhou dobu spojována s buněčným poškozením vedoucím až k smrti buňky (Choi, 1987). Tato tzv. buněčná

excitotoxicita, jak byl daný jev popsán v roce 1969 v práci (Olney, 1969), se v organismu vyskytuje při akutních patologických stavech, jakými jsou mrtvice a traumatické poranění mozku, ale i při chronických neurodegenerativních onemocněních, mezi které patří Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba a Parkinsonova choroba (Parsons & Raymond, 2014; Wang & Reddy, 2017). V tomto případě by bylo výhodné využít inhibitory NMDA receptorů k zamezení jejich zvýšené aktivity. Vzhledem k silným nežádoucím účinkům inhibice pomocí obecných NMDAR blokátorů (viz výše) je ale jejich použití jako možné terapie onemocnění a patologií souvisejících s neuronální excitotoxicitou velmi limitované (Parsons & Raymond, 2014). Selektivní blokování abnormálně zvýšené aktivity NMDAR se současným zachováním bazální synaptické aktivity se však ukazuje jako poměrně účinný způsob, jak excitotoxicitě a patologiím s ní spojenými zabránit. Existují látky, které v *in vitro* a *in vivo* modelech dosahují dobrých výsledků v blokování nežádoucí aktivity NMDAR, a zároveň nevykazují výše popsané nežádoucí účinky (Chen et al., 1992; Vyklicky et al., 2016; Xia, Chen, Zhang, & Lipton, 2010). Studium nových selektivních inhibitorů NMDAR je tedy žádoucí a mohlo by představovat efektivní způsob, jak léčit onemocnění spojené s buněčnou excitotoxicitou.

S ohledem na patologické účinky jak hypofunkce, tak i zvýšené aktivity NMDA receptorů, může být potenciace i inhibice NMDAR za různých okolností klinicky prospěšná. V zájmu je tedy porozumět nejen složení, lokalizaci a mechanismu fungování samotných NMDA receptorů, ale také působení a účinnosti jednotlivých modulátorů aktivity NMDAR k jejich případnému využití v léčbě a prevenci výše zmíněných abnormálních stavů. Tato práce se soustředí především na neuronální excitotoxicitu způsobenou nadměrnou aktivací NMDAR a na metody jejího zkoumání v modelech *in vitro* na akutní úrovni, a dále pak na známé negativní modulátory (inhibitory) aktivity NMDA receptorů a jejich neuroprotektivní vlastnosti.

2. NMDA receptory a jejich funkce v CNS

2.1. Aktivace NMDAR

NMDA receptory, pojmenované podle jednoho ze svých selektivních agonistů N-methyl-D-aspartátu, patří do rodiny ionotropních glutamátových receptorů, tzv. iGluR, a spolu s dalšími typy receptorů z této skupiny, AMPA a kainátovými receptory, zprostředkovávají transmissi signálu mezi presynaptickým a postsynaptickým neuronem přenášeného neurotransmiterem glutamátem (Zhu et al., 2016). Ke své aktivaci potřebují dvojitý stimul, což je činí odlišnými od ostatních typů iGluR, a to konkrétně odstranění Mg^{2+} bloku, a zároveň navázání molekul glutamátu a glycinu, popř. D-serinu (Hansen et al., 2018; Johnson & Ascher, 1987; Nowak et al., 1984). NMDAR se tedy dají vzhledem k těmto vlastnostem a jejich funkci označit za ligandem a napěťově ovládané iontové kanály, jak shrnuje (Hansen et al., 2018).

Během synaptické transmise dochází prostřednictvím vylití váčků s glutamátem do synaptické štěrby k rychlé aktivaci AMPA či kainátových receptorů, které tak umožní vtok Na^+ iontů dovnitř postsynaptického neuronu a jehož následná depolarizace pak odstraní Mg^{2+} kation z iontového kanálu NMDAR a umožní tak jeho aktivaci (Hansen et al., 2018). K aktivaci NMDA receptoru je také nutná vazba glycinu jakožto koagonisty (Wolosker, 2007). Při navázání glutamátu na NMDAR pak dochází k sérii konformačních změn receptoru vedoucích k otevření jeho iontového kanálu, tzv. gatingu, a k následnému vtoku vápenatých kationtů dovnitř buňky (Hansen et al., 2018). Oproti AMPA receptorům probíhá otevírání iontového kanálu NMDA receptorů a i samotné ukončení excitačního přenosu znatelně pomaleji, a to v řádu desítek až stovek milisekund (Hestrin, Nicoll, Perkel, & Sah, 1990).

Tok extracelulárních Ca^{2+} iontů do postsynaptického neuronu spojený s aktivací NMDA receptorů má za následek aktivaci řady signálních kaskád a buněčných procesů včetně pozměněné genové exprese, které jsou za daných podmínek nezbytné pro přežití neuronů a jejich správnou funkci (Hardingham & Bading, 2010). Nadměrný vtok Ca^{2+} kationtů je však zároveň za určitých okolností neurotoxický a vyvolává buněčnou signalizaci vedoucí mimo jiné k blokování již zmíněných pro-survival kaskád a končící buněčnou smrtí, jak bylo shrnuto v práci (Hardingham & Bading, 2010).

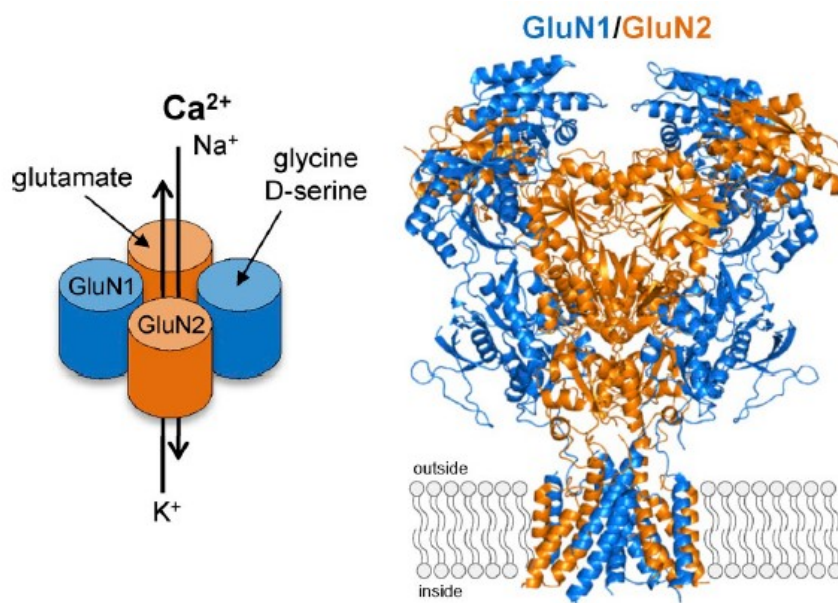
Z časového hlediska můžeme aktivaci NMDA receptorů rozdělit na fazickou a tonickou (V. Vyklícky et al., 2014). Fazicky jsou NMDAR aktivovány transientně zvýšenou hladinou synapticky uvolňovaného glutamátu o koncentraci asi 1mM, a to po dobu 1 - 2 ms (Clements,

Lester, Tong, Jahr, & Westbrook, 1992; V. Vyklicky et al., 2014). Tato aktivita je základem správné fyziologické funkce NMDAR. Naopak tonická aktivace NMDAR je indukovaná dlouhodobě patologicky zvýšenou koncentrací glutamátu (v řádu μM), a tato nadměrná aktivace pak vede k excitotoxicitě NMDA receptorů, vyskytující se v řadě neuropatologických podmínek (Olney, 1969; V. Vyklicky et al., 2014). Této buněčné excitotoxicitě a možnosti její inhibice se tato práce bude věnovat v následujících kapitolách.

2.2. Struktura NMDAR a jejich podjednotky

N-methyl-D-aspartátové receptory jsou tvořeny třemi různými typy podjednotek, a to GluN1, GluN2 a GluN3 (Hansen et al., 2018; Monyer et al., 1992). Díky alternativnímu sestřihu vzniká z jednoho genu kódujícího podjednotku GluN1 až osm izoforem této podjednotky (Durand et al., 2006; Moriyoshi et al., 1991; Sugihara, Moriyoshi, Ishii, Masu, & Nakanishi, 1992). GluN2 podjednotky se dále dělí na GluN2A - GluN2D, které jsou kódovány čtyřmi různými geny, GluN3 pak rozlišujeme na GluN3A a GluN3B kódovanými dvěma samostatnými geny (Monyer et al., 1992; Vyklicky et al., 2014).

Funkční NMDA receptory se vyskytují v organismu jako heterotetramery, skládající se vždy z dvou obligátních GluN1 podjednotek a pak buď z dalších dvou GluN2, dvou GluN3, či vzácněji z kombinace jedné GluN2 a jedné GluN3 podjednotky (Obr. 1) (Laube, Kuhse, & Betz, 1998; Monyer et al., 1992; Ulbrich & Isacoff, 2008). Existence výše zmíněných variant podjednotek NMDA receptorů a jejich kombinací tak dává vzniknout vysoké variabilitě subtypů NMDAR exprimovaných v CNS, jak bylo shrnuto v (Paoletti et al., 2013), a tato variabilita má za následek i specifické biofyzikální vlastnosti jednotlivých receptorových subtypů a jejich vliv na fungování neuronů, vývoj nervové soustavy a synaptickou plasticitu, jak uvádí (Hansen et al., 2018).



Obr. 1. Struktura NMDA receptoru. Vlevo schematické znázornění heterotetramerního NMDAR s iontovým kanálem uprostřed, propustným pro Ca^{2+} , K^{+} a Na^{+} ionty, vpravo krystalová struktura NMDAR skládajícího se ze dvou GluN1 a dvou GluN2 podjednotek (z celkové struktury NMDAR byly autorem vynechány intracelulární CTD). Převzato z (Hansen et al., 2018).

GluN1, GluN2 i GluN3 subtypy podjednotek mají strukturně obdobné uspořádání sestávající ze čtyř semiautonomních domén, a to z extracelulárních ATD (amino-terminal domain) a LBD (ligand-binding domain), transmembránové TMD (transmembrane domain) a intracelulární CTD (carboxyl-terminal domain), jak je shrnuto v práci (Traynelis et al., 2010), a toto doménové složení je pak podobné i u podjednotek ostatních členů rodiny ionotropních glutamátových receptorů (Hansen et al., 2018).

GluN1 podjednotky obsahují vazebné místo pro glycin nebo D-serin (Ivanovic, Reiländer, Laube, & Kuhse, 1998; Kuryatov, Laube, Betz, & Kuhse, 1994; Wafford et al., 1995), podobně jako GluN3A a GluN3B typy podjednotek (Chatterton et al., 2002; Yao, Harrison, Freddolino, Schulten, & Mayer, 2008; Yao & Mayer, 2006). Oproti receptorům obsahujícím v sobě i některou z GluN2 podjednotek potřebují ke své aktivaci receptory tvořené pouze GluN1 a GluN3 navázán pouze glycin (Chatterton et al., 2002), jak bylo zjištěno na výzkumu NMDA receptorů exprimovaných v oocytech *Xenopus laevis*.

GluN2 podjednotky naopak nesou vazebné místo pro L-glutamát (Laube, Hirai, Sturgess, Betz, & Kuhse, 1997). GluN2 subtypy jsou asi jen z 15 % sekvenčně identické s GluN1, ale mezi sebou vykazují jednotlivé GluN2 podjednotky asi 50 % homologii

(Ishii et al., 1993). Právě přítomnost specifických GluN2A – GluN2D podjednotek v receptoru je jedním z nejsilnějších determinantů rozdílných fyziologických funkcí exprimovaných NMDA receptorů (Paoletti et al., 2013). Základní vlastnosti NMDA receptorů, jako je jejich propustnost pro Ca^{2+} ionty a aktivace navázáním glutamátu a glycinu či D-serinu, zůstávají téměř neměnné i s různými možnými kombinacemi GluN1 s GluN2 typy podjednotek, ale navzájem se liší např. v afinitě k agonistům, efektivitě působení antagonistů i síle napětově řízeného bloku Mg^{2+} iontu (Ishii et al., 1993; Kutsuwada et al., 1992; Monyer et al., 1992). Mezi konkrétní příklady výše zmíněných odlišností patří např. vyšší citlivost GluN1-GluN2A a GluN1-GluN2B receptorů k bloku hořčnatým kationtem než u GluN1-GluN2C a GluN1-GluN2D receptorů, či rozdílná kinetika gatingu GluN1-GluN2A receptorů oproti ostatním podtypům (Monyer, Burnashev, Laurie, Sakmann, & Seeburg, 1994; Monyer et al., 1992).

V práci (Liu et al., 2007) navíc tvrdí, že právě NMDAR obsahující GluN2B podjednotky se zásadním způsobem podílejí na vzniku buněčné excitotoxicity v CNS. Ve své studii, kde úroveň buněčné smrti sledovali pomocí měření hladiny uvolněné laktátdehydrogenázy (LDH) ukázali, že při aplikaci GluN2B specifického antagonisty Ro-256981 ($0,5 \mu\text{M}$) bylo zabráněno nekrotické smrti navozené $50 \mu\text{M}$ NMDA a došlo ke snížení apoptotických projevů v buňkách. Antagonista inhibující receptory obsahující GluN2A podjednotky NVP-AAM077 ($0,4 \mu\text{M}$) nekrotické smrti neuronů zabránit nedokázal a jeho přítomnost ještě zhoršila projevy apoptózy (Liu et al., 2007). Autoři tedy navrhli možnost, že spíše než způsob aktivace či lokalizace NMDA receptorů se na buněčné excitotoxicitě podílí specifické podjednotkové složení NMDAR.

2.3. Lokalizace NMDAR v CNS

Jednotlivé subtypy NMDA receptorů tvořené různými kombinacemi podjednotek se kromě svých vlastností liší také v lokalizaci na subcelulární úrovni i v jejich celkové abundanci v CNS. Exprese NMDA receptorů se zároveň značně proměňuje v průběhu vývoje CNS, a to již od brzkých embryonálních stádií až po dospělce (Paoletti et al., 2013).

Vzhledem ke zřejmě nutné účasti dvou GluN1 podjednotek v plně funkčním NMDA receptoru je jejich exprese na vysoké úrovni prakticky v celé CNS již od časných embryonálních stádií (embryonic day 14, E14; studováno na krysím modelu) a od E17 až do dospělosti se jedná o nejhojněji exprimované podjednotky (Akazawa, Shigemoto, Bessho, Nakanishi, & Mizuno, 1994; Monyer et al., 1994). Exprese GluN2 podjednotek se však dramaticky liší v průběhu celého vývoje mozku, kdy k největším změnám uspořádání dochází

především v prvních dvou týdnech postnatálního vývoje, jak bylo shrnuto v práci (Paoletti et al., 2013). GluN2B a GluN2D jsou jediné GluN2 podjednotky, které jsou exprimovány během embryonálních stádií. V prvním týdnu po porodu se pak ve vyvíjejícím se mozku nachází nejčastěji GluN2B subtyp a zároveň se zvyšuje exprese GluN2A, ve druhém postnatálním týdnu pak můžeme pozorovat nárůst exprese GluN2A, GluN2B i GluN2C podjednotek a zároveň snížení exprese GluN2D (Monyer et al., 1994). V dospělém mozku se z GluN2 podjednotek nejhojněji vyskytují právě GluN2A a GluN2B podjednotky a jsou ve vysoké koncentraci především v hipokampu a kortexu (Monyer et al., 1994).

Expresce GluN3 subtypů podjednotek také podléhá výrazným změnám v průběhu vývoje CNS. GluN3A podjednotky jsou v embryonálních stádiích jen málo exprimovány, v průběhu časného postnatálního vývoje dochází k výraznému zvýšení jejich exprese a v dospělosti pak opět k jejímu útlumu (Henson, Roberts, Pérez-Otaño, & Philpot, 2010; Wong et al., 2002). Naopak GluN3B podjednotky se v CNS vyskytují v časném postnatálním období poměrně málo a ke zvýšení jejich exprese dochází od 10. postnatálního dne až do dospělosti, kdy je ve vysoké míře můžeme nalézt hlavně na motoneuronech (Henson et al., 2010; Nishi, Hinds, Lu, Kawata, & Hayashi, 2001).

Jak shrnuje (Hardingham & Bading, 2010), na subcelulární úrovni mají NMDA receptory především postsynaptickou lokalizaci, a to jak v samotných excitačních synapsích, kde NMDAR pak označujeme jako synaptické, ale i v membránách mimo synapse, tzv. extrasynaptické NMDAR, které se mohou nacházet na tělech neuronů, dendritech a v blízkosti postsynaptické denzity (tzv. perisynaptické NMDA receptory). Obecně se uvádí, že v synapsích se ve větší míře nacházejí především diheteromerní GluN1-GluN2A receptory a perisynaptická a extrasynaptická část populace NMDAR je tvořena hlavně diheteromerními GluN1-GluN2B receptory (Steigerwald et al., 2000; Stocca & Vicini, 1998; Tovar & Westbrook, 1999). Bylo ale zjištěno, že i triheteromerní GluN1-GluN2A-GluN2B NMDAR představují v dospělém mozku podstatnou část synaptických NMDA receptorů, především v kortexu a hipokampu (Rauner & Köhr, 2011). Kromě postsynaptických NMDAR ale existují ještě i NMDA receptory vyskytující se presynapticky, které hrají taktéž důležitou roli v regulaci synaptické transmise a plasticity (Banerjee et al., 2016; Berretta & Jones, 1996).

3. Excitotoxicita NMDA receptorů

Buněčná excitotoxicita je jev způsobovaný nadměrnou aktivací NMDA receptorů patologicky zvýšenou koncentrací excitační aminokyseliny glutamátu, která vede k silnému influxu Ca^{2+} iontů dovnitř neuronů a ke spuštění řady destruktivních efektů v buňce, jako je mitochondriální dysfunkce a vznik ROS (reactive oxygen species neboli reaktivní formy kyslíku) (Rego & Oliveira, 2003), končících buněčnou smrtí (Choi, 1987; Olney, 1969). Jak shrnuje (Lipton, 2004), můžeme jí dělit na excitotoxicitu akutní a chronickou. K akutní excitotoxicitě dochází v organismu např. při závažných mechanických poraněních CNS, kdy je glutamát hromadně uvolňován z poraněných neuronů a způsobuje tak depolarizaci, lýzi a nekrotickou smrt dalších okolních buněk (Lipton, 2004). Akutní excitotoxicita vzniká také při hypoxických-ischemických podmínkách provázejících mozkovou mrtvici (Rothman & Olney, 1986), kdy nedostatek kyslíku a energie potřebné pro udržování homeostázy a iontové rovnováhy způsobí depolarizaci buněk a následně pak i jejich smrt analogicky k traumatickému poranění zmíněnému výše (Lipton, 2004). Chronická excitotoxicita je pak navozená dlouhodobě mírně zvýšenou koncentrací glutamátu či hyperaktivitou samotných NMDA receptorů a vede k projevům řady neurodegenerativních onemocnění, jakými jsou Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba, Parkinsonova choroba, demence a další (Hardingham & Bading, 2010; Lipton, 2004). Tato kapitola se dále zaměří především na akutní excitotoxicitu a její následky a taktéž na modely, ve kterých ji můžeme zkoumat.

3.1. Původ zvýšené koncentrace glutamátu

Na zvýšené koncentraci glutamátu při buněčné excitotoxicitě se může podílet několik různých zdrojů. Jak shrnuje (Parsons & Raymond, 2014), při hypoxických-ischemických podmínkách dochází nejdříve (15 – 30 s po odstranění kyslíku) ke zvýšenému spontánnímu presynaptickému uvolňování glutamátu (Fleidervish, Gebhardt, Astman, Gutnick, & Heinemann, 2001), ale následně v řádu několika minut i k nesprávné funkci neuronálních glutamátových transportérů (Jabaudon, Scanziani, Gähwiler, & Gerber, 2000; Rossi, Oshima, & Attwell, 2000). Ty za normálních podmínek glutamát ze synaptické štěrby vychytávají a chrání tak neurony před buněčnou smrtí, při ischemii však dochází k převrácení jejich funkce a glutamát se tak přes ně ještě více uvolňuje do extracelulárních prostor (Rossi et al., 2000). Nejenom neuronální, ale i gliové transportéry (např. GLT-1) hrají za normálních podmínek důležitou roli ve zpětném vychytávání glutamátu, ale autoři této studie tvrdí, že alespoň při hypoxii se na tomto převráceném fungování podílejí především transportéry neuronálního původu (Rossi et al., 2000). Data ohledně směru transportu glutamátu při akutní excitotoxicitě

ale nejsou jednoznačná. Například (Wroge, Hogins, Eisenman, & Mennerick, 2012) nechali neurony inkubovat po dobu 2,5 h v hypoxických podmínkách a míru jejich přežití pak analyzovali 24 h poté. Při použití 100 μM TBOA (DL-*threo*- β -benzyloxyaspartát), širokospektrálního blokátoru glutamátových transportérů (Shimamoto et al., 2004), se v hypoxických podmínkách smrt neuronů výrazně zvýšila, což ukazuje, že v daném modelu excitotoxicity se glutamátové transportéry podíleli na vychytávání extracelulárního glutamátu a tím působili neuroprotektivně. Role glutamátových transportérů při akutní excitotoxicitě tedy zůstává předmětem dalšího bádání.

3.2. Protichůdné účinky aktivity NMDAR

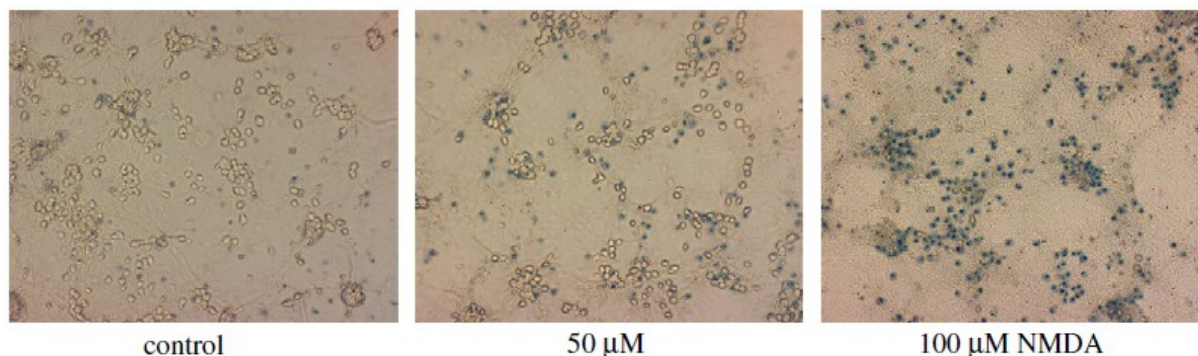
Silný influx Ca^{2+} dovnitř neuronů indukovaný zvýšenou aktivitou NMDA receptorů je hlavním mediátorem buněčné excitotoxicity (Choi, 1987; Choi, Koh, & Peters, 1988). Zároveň jsou ale Ca^{2+} ionty nedílnou součástí aktivace signálních kaskád a buněčných procesů zajišťujících neuroprotektci, jak shrnuje (Hardingham & Bading, 2010). To, zda bude mít influx Ca^{2+} negativní či pozitivní účinek na neurony je v mnoha studiích připisováno skutečnosti, zda je tok vápníku zprostředkován extrasynaptickými, či synaptickými NMDAR. Negativní účinek vtoku Ca^{2+} iontů do neuronů bývá připisován patologické aktivaci extrasynaptických NMDAR, přičemž synaptické receptory a jejich aktivita jsou spojovány s převážně neuroprotektivními účinky (Hardingham & Bading, 2010).

Mezi konkrétní příklady opačných efektů extrasynapticky a synapticky lokalizovaných NMDAR se uvádí např. regulace CREB (cAMP response element binding protein) fosforylace a transkripce zprostředkované CREB. Jak ve své studii ukázali (Hardingham, Fukunaga, & Bading, 2002), synaptická stimulace NMDA receptorů pomocí bicucullinu a 4-AP (4-aminopyridin) indukovala robustní fosforylaci CREB a CREB-dependentní transkripci, zatímco akutní aplikace 40 μM NMDA či 40 μM glutamátu, aktivující kromě synaptických NMDAR i ty extrasynaptické, spustila defosforylaci CREB, inhibovala CREB-dependentní genovou expresi a indukovala tzv. CREB shut-off dráhu (Hardingham et al., 2002). Dalšími příklady rozdílů mezi extrasynaptickými a synaptickými NMDAR jsou např. různé účinky na ERK (extracellular signal-regulated kinase) dráhu, pro-apoptotické signální dráhy a antioxidační obranné mechanismy (Léveillé et al., 2008, 2010; Papadia et al., 2008). Zůstává ovšem otázkou, zda dané rozdíly vyplývají čistě ze specifické lokalizace NMDA receptorů, nebo zda na tyto rozdíly nemá větší vliv spíše způsob aktivace NMDAR.

3.3. Akutní excitotoxicita NMDAR a metody jejího zkoumání

Smrt neuronů v důsledku akutní excitotoxicity NMDA receptorů je zpočátku především nekrotického charakteru, ale později se k nekróze přidává i smrt apoptotická, jak je shrnuto v (Lipton, 2004). Akutní glutamátová excitotoxicita má dvě fáze. První, časná fáze se vyznačuje nabytím buněčného objemu (tzv. swelling), které je způsobené rychlým influxem Na^+ do buňky. Druhá, pozdější fáze je spojována s vtokem Ca^{2+} přes aktivované NMDA receptory a končí rozpadem a následnou smrtí buňky (Choi, 1987). Mezi nejvyužívanější *in vitro* modely, kterými můžeme excitotoxickou smrt neuronů zkoumat, patří především tzv. bath pokusy a OGD (oxygen-glucose deprivation) pokus.

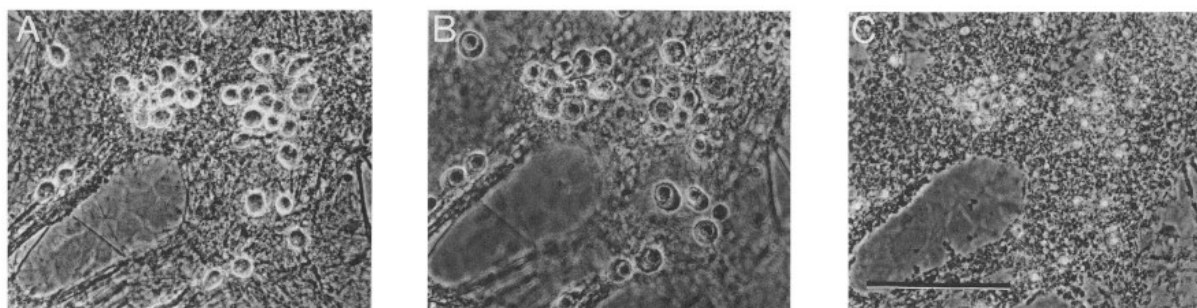
Princip bath pokusu spočívá v aplikaci NMDAR agonisty (většinou NMDA, ale využíván bývá i glutamát) na kulturu neuronů (často hipokampálních či kortikálních), a to obvykle o koncentraci v řádu desítek až stovek μM , a po následném přemístění kultury do čerstvého média pak ke stanovení míry buněčné smrti, často 24 h po experimentu, viz např. následující studie (Engelhardt et al., 2007; Hardingham et al., 2002; Martel, Wyllie, & Hardingham, 2009; Papadia et al., 2008). Obr. 2 ukazuje výsledky NMDA bath pokusu s použitím různých koncentrací NMDA.



Obr. 2. Příklad výsledků NMDA bath pokusu. Se stoupající koncentrací použitého NMDA roste i buněčná smrt. Fotografie pořízeny v brightfield mikroskopu, mrtvé buňky obarvené trypan blue (0,4 %) pro následnou kvantifikaci buněčné smrti. Převzato z (Engelhardt et al., 2007).

OGD experiment je založen na přesunutí neuronů do média bez glukózy a vložení do anaerobní komory obsahující běžně směs plynů s 5 % CO_2 a 95 % N_2 (Emnett et al., 2013; Wroge et al., 2012). Kvantifikaci buněčné smrti pak lze provést např. pomocí měření LDH, která je uvolňována do média rozpadajícími se buňkami (Koh & Choi, 1987), či s využitím barvicích látek, jako je trypan blue, DAPI (4',6-diamidin-2-fenyindol), Hoechst-33342 nebo

propidium iodid, jak bylo použito např. v pracích (Emnett et al., 2013; Engelhardt et al., 2007; Liu et al., 2007; Martel et al., 2009). Výsledky jednoho experimentu s využitím OGD jsou ukázány na Obr. 3. Doba inkubace neuronů v hypoxické komoře při OGD, inkubace buněk v médiu s přítomným agonistou při bath pokusech i koncentrace použitého agonisty a dalších složek média se mohou lišit experiment od experimentu, a v této práci je tedy popsáno pouze několik příkladů podle konkrétních studií.



Obr. 3. Příklad výsledků OGD pokusu. Buňky byly podrobeny 50 min OGD inzultu, fotografie pořízeny v mikroskopu s fázovým kontrastem A) před začátkem inzultu, B) ihned po ukončení pokusu a C) 24 h po ukončení OGD. Na fotografii B) lze pozorovat swelling neuronálních těl, na fotografii C) pak již rozpadlé mrtvé buňky. Upraveno a převzato z (Goldberg & Choi, 1993).

Funkce NMDA receptorů lze pak zkoumat nejen na neuronech, ale často se k tomu využívají i transfekované HEK293 buněčné linie (Human Embryonic Kidney cell), kde je možné dobře pozorovat činnost rekombinantních NMDA receptorů, jak je demonstrováno ve studii (Vyklícky et al., 2015). Pokud je v našem zájmu zkoumat jednotlivé subpopulace NMDA receptorů, a to konkrétně jak dopady jejich aktivace, tak i účinky různých NMDAR modulátorů, můžeme k tomu použít speciálně upravených postupů.

Jak bylo popsáno v práci (Hardingham et al., 2002), ke studiu izolovaných extrasynaptických receptorů lze nejdříve synaptické receptory aktivovat aplikací bicucullinu, který způsobí silnou excitační synaptickou aktivitu neuronů, a následně je pak inhibovat blokátorem iontového kanálu MK-801. Tento postup ponechá extrasynaptické NMDAR, které nebyly aktivovány neblokované a využitelné pro další postup (Hardingham et al., 2002). Pokud chceme zkoumat NMDAR na základě jejich specifického podjednotkového složení, lze také využít selektivní blokace pomocí specifických inhibitorů. Jak bylo ukázáno ve studii (Liu et al., 2007), pro selektivní inhibici receptorů obsahujících GluN2B podjednotky lze využít Ro 25-6981 (Fischer et al., 1997), případně ifenprodil (Williams, 2001), pro inhibici receptorů

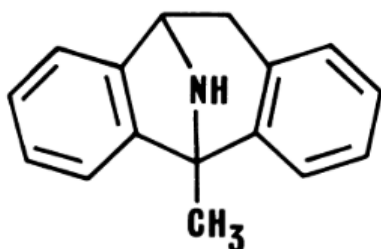
s GluN2A podjednotkami pak NVP-AAM077 (Liu et al., 2007), nebo nověji charakterizovanou sloučeninu TCN-201 (Bettini et al., 2010; V. Vyklicky et al., 2014). Všechny výše zmíněné metody pak lze využít ke zkoumání účinků různorodých modulátorů aktivity NMDA receptorů a jejich efektů na NMDAR indukovanou excitotoxicitu, a k hledání nových terapeuticky využitelných látek schopných inhibovat škodlivou aktivitu NMDAR a zabránit tak neuronální degeneraci.

4. Modulátory aktivity NMDA receptorů

Funkci NMDA receptorů lze modulovat pozitivně i negativně. NMDAR mohou být inhibovány různými druhy antagonistů lišících se podle místa vazby na receptor a jejich mechanismu působení (Vyklicky et al., 2014). Plošná blokace NMDA receptorů však v organismu způsobuje silné nežádoucí vedlejší účinky (Balu, 2016). Klinicky použitelné inhibitory by tedy měly být schopny selektivně blokovat excesivní patologickou aktivaci NMDAR s minimálním účinkem na jejich aktivaci fyziologickou, aby tyto vedlejší účinky vůbec nevznikaly (Lipton, 2004). NMDAR antagonisty můžeme rozdělit do několika kategorií, a to na kompetitivní antagonisty, nekompetitivní antagonisty a blokátory iontového kanálu (V. Vyklicky et al., 2014). Kompetitivní antagonisté se váží do vazebného místa pro agonistu (glutamát či glycin). Tím, že soutěží s agonistou o možnost navázání na receptor nejsou příliš vhodné pro terapeutické využití, protože při patologicky dlouhodobě zvýšené koncentraci agonisty by byly z vazebného místa na receptoru molekulami agonisty vytlačovány a nedocházelo by tedy k požadovanému blokování nadměrné aktivity NMDAR. (Lipton, 2004). Klinicky zajímavější jsou pak zejména tzv. use-dependent inhibitory, které se váží na receptory pouze v aktivovaném stavu, a to zároveň tím lépe, čím vyšší je koncentrace přítomného agonisty. Tímto tedy mohou efektivně inhibovat právě nadměrně aktivované NMDA receptory (Lipton, 2004). Mezi use-dependent antagonisty se řadí blokátory NMDAR kanálu (např. MK-801 nebo memantin) a nekompetitivní antagonisté steroidního původu (např. pregnanolon sulfát). A právě use-dependent mechanismus, stejně jako další vlastnosti farmakologicky vhodných inhibitorů NMDAR, jako je napětově nezávislá inhibice a rychlé či use-independent odváznutí inhibitoru, se ukazuje být účinný v selektivní inhibici pouze patologické aktivity NMDAR, jak bylo shrnuto v práci (V. Vyklicky et al., 2014).

4.1. Blokátory iontového kanálu

4.1.1. MK-801



Obr. 4. Chemická struktura MK-801 (dizocilpinu). Převzato z (Wong et al., 1986).

Jedním z inhibitorů NMDA receptorů využívaných v dnešní době zejména ve výzkumu aktivity NMDAR je dizocilpin neboli MK-801 (Obr. 4). MK-801 působí jako blokátor iontového kanálu NMDA receptorů a use-dependent inhibitor, což znamená, že k jeho navázání dovnitř kanálu je nejdříve potřeba NMDA receptory aktivovat (Huettner & Bean, 1988; Wong et al., 1986). MK-801 se zároveň označuje za tzv. voltage-dependent antagonistu, jehož blok NMDAR se s vyšší mírou depolarizace neuronů snižuje (MacDonald et al., 1991). Spolu s disociativními anestetiky PCP a ketaminem (Anis, Berry, Burton, & Lodge, 1983; Halliwell, Peters, & Lambert, 1989) se dizocilpin řadí mezi tzv. nekompetitivní antagonisty NMDAR, jejichž inhibiční působení je zajištěno navázáním na receptor mimo vazebné místo pro agonistu (Huettner & Bean, 1988; Wong et al., 1986).

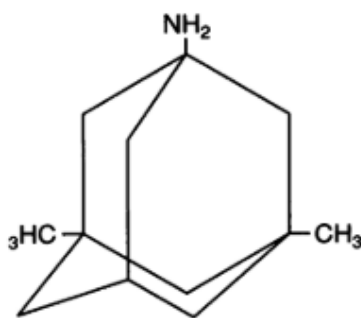
Blok NMDA receptorů pomocí MK-801 je velmi stabilní a přetrvává i po odmytí antagonisty z média (Huettner & Bean, 1988). To poukazuje i na use-dependent mechanismus odvázaní MK-801, tedy že i pro jeho uvolnění z iontového kanálu je třeba, aby byl NMDA receptor v aktivovaném stavu (Huettner & Bean, 1988). Vzhledem k vysoké afinitě dizocilpinu k NMDAR a jeho pomalému odstraňování z receptorového kanálu je pro účel některých experimentů považován jeho blok NMDAR za ireverzibilní a ve výzkumu tak bývá využíván k permanentnímu blokování určité populace NMDA receptorů, viz např. (Hardingham et al., 2002). Jak ale tvrdí (McKay, Bengtson, Bading, Wyllie, & Hardingham, 2013), mnohé studie ukázaly, že blok MK-801 za nevratný považovat nelze, obzvláště pak v dlouhodobějším měřítku. Uvolňování MK-801 z jeho vazebného místa je urychleno opakovanou aplikací agonisty NMDA, který kanál uvede opět do aktivovaného stavu a umožní tak odvázaní MK-801 (Huettner & Bean, 1988; McKay et al., 2013). Přítomnost Mg^{2+} v médiu rychlost odstranění dizocilpinu z NMDAR ještě víc umocňuje, stejně tak jako další nekompetitivní antagonisté,

kteří se stejně jako MK-801 váží do tzv. PCP vazebných míst uvnitř iontového kanálu NMDAR a soutěží tak s MK-801 o jeho opětovné navázání (McKay et al., 2013).

MK-801 bývá označován jako účinné antikonvulzivum a díky tomu našel uplatnění ve studiu modelů epilepsie (Sato, Morimoto, & Okamoto, 1988). V některých studiích je MK-801 a dalším výše zmíněným antagonistům přisuzována ochrana neuronů před excitotoxicitou a jí dále způsobenými poškozeními CNS vznikajícími např. v hypoxických/ischemických podmínkách (Foster, Gill, Kemp, & Woodruff, 1987; Foster, Gill, & Woodruff, 1988; McDonald, Silverstein, & Johnston, 1987). V práci (Buchan, Li, & Pulsinelli, 1991) však neuroprotektivní vlastnosti MK-801 nebyly pozorovány a podání MK-801 nezabránilo v dospělých potkanech degeneraci neuronů způsobené těžkou ischemií. Při inhibici NMDAR dizocilpinem či PCP navíc nastávají v neuronech patologické změny jako je např. vakuolizace cytoplazmy (John W Olney, Labruyere, & Price, 1989) a ve studii (Ikonomidou et al., 1999) způsobilo blokování NMDA receptorů pomocí MK-801 v neonatálních stádiích potkaního modelu vlnu apoptotické neurodegenerace a rozsáhlé úbytky neuronů v CNS.

Omezení klinického využití MK-801 pak vyplývají především ze silných negativních vedlejších účinků, které se objevují při jeho použití v modelech *in vivo*. Aplikace MK-801 v *in vivo* modelech je spojována s výraznými kognitivními, motorickými a behaviorálními poruchami, které připomínají ty provázející schizofrenii (Gilmour et al., 2009; Koek, Woods, & Winger, 1988). Případné použití dizocilpinu tak zůstává relevantní spíše ve výzkumu hypofunkce NMDA receptorů a patologií, které z ní pramení než jako potenciální terapeutická látka bránící buněčné excitotoxicitě.

4.1.2. Memantin



Obr. 5. Chemická struktura memantinu. Převzato z (Chen & Lipton, 1997).

Memantin (Obr. 5) je dalším selektivním inhibitorem NMDAR z třídy nekompetitivních use-dependent antagonistů, ale v některých svých vlastnostech se výrazně odlišuje od látek již zmíněných výše. Stejně jako MK-801 inhibuje memantin NMDA receptory jako blokátor jejich iontového kanálu (Chen et al., 1992), ale je oproti němu mnohem lépe klinicky tolerován i v terapeuticky relevantních koncentracích (1-10 μM). Díky této dobré snášenlivosti je memantin již několik desetiletí studován v souvislosti s jeho pozitivními účinky u pacientů s neurodegenerativními onemocněními spojenými s buněčnou excitotoxicitou, jako je Alzheimerova choroba, demence a Parkinsonova choroba, jak bylo shrnuto v práci (Olivares et al., 2012).

Jednou z výhodných vlastností memantinu ve srovnání s MK-801 je jeho rychlá kinetika působení, tedy schopnost rychle blok vytvořit a rychle se i uvolnit z vazebného místa uvnitř iontového kanálu NMDAR (Chen et al., 1992). Oproti MK-801 má také k vazebnému místu na NMDAR nižší afinitu. Naopak nevýhodou memantinu jako inhibitoru NMDAR je jeho silně napětově závislé působení, jelikož v patologicky depolarizovaných neuronech není blokace NMDAR efektivní (Chen & Lipton, 1997; Lipton, 2004; V. Vyklicky et al., 2014). Důležitou vlastností memantinu jako use-dependent inhibitoru je, že účinnost jeho inhibice stoupá s rostoucí koncentrací přítomného agonisty (Chen & Lipton, 1997; Chen et al., 1992). Jak bylo ukázáno v práci (Chen et al., 1992) pomocí elektrofyzilogických měření na potkaních retinálních gangliových buňkách, memantin o stálé koncentraci 6 μM inhiboval proudy evokované akutně aplikovaným 200 μM NMDA asi z 85 %, ale proudy aktivovaných 5 μM NMDA jen asi z 58 %. Při zkoumání vlivu memantinu na excitotoxicitu způsobenou aplikací NMDA bylo ve stejné práci zjištěno, že memantin dokázal zabránit nadměrnému influxu Ca^{2+} iontů vznikajícím po aplikaci NMDA a předejít také buněčné smrti navozené zvýšenou

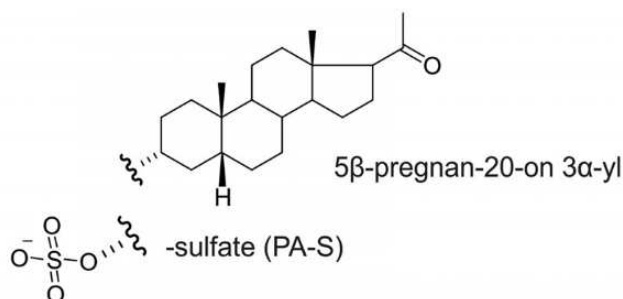
hladinou endogenního glutamátu při použití média s vysokou koncentrací Ca^{2+} a nízkou koncentrací Mg^{2+} (Chen et al., 1992).

Jak bylo shrnuto v práci (Lipton, 2004), memantin je díky svým vlastnostem schopen zabránit buněčné smrti vznikající při patologických podmínkách, kdy je abnormálně zvýšená koncentrace agonisty, ale přitom ponechat bazální aktivitu NMDAR spojenou s normální synaptickou transmisí, udržováním LTP (long-term potentiation) a celkovým zachováním fyziologické funkce neuronů. Podle (Xia et al., 2010) je za touto zásadní charakteristikou memantinu jeho selektivní inhibice extrasynaptických NMDAR, jejichž aktivace je podle některých teorií hlavní příčinnou neuronální excitotoxicity (Hardingham & Bading, 2010; Hardingham et al., 2002). Ve studii (Xia et al., 2010), kde experimentálně mimikovali patologické podmínky použitím média s 1mM Mg^{2+} a potenciálu o velikosti -25 mV, ukázali, že memantin (10 μM) blokoval synapticky aktivované proudy NMDAR asi z 38,9 %, zato proudy extrasynaptických NMDAR až z 64,3 %. V dalších studiích bylo ovšem popsáno, že memantin dokáže inhibovat ve vysoké míře i synaptické NMDAR (Wroge et al., 2012), pokud jsou nadměrně aktivovány a tedy vystaveny abnormálním podmínkám. Jak ukázali ve své práci (Wroge et al., 2012), synaptické proudy NMDAR evokované inkubací neuronů v médiu s 50 μM NMDA, 10 μM glycinu a 2 mM Ca^{2+} , tedy v podmínkách navozujících nadměrnou aktivaci synaptických NMDAR, způsobovaly zvýšenou neuronální smrt (Wroge et al., 2012). Z toho vyplývá, že excesivní aktivace nejen extrasynaptických NMDAR, ale i těch synaptických je zodpovědná za buněčnou excitotoxicitu. V dalším pokusu této studie bylo také ukázáno, že kontinuálně aplikovaný memantin o neuroprotektivní koncentraci 10 μM progresivně inhiboval NMDAR složku EPSCs (excitatory postsynaptic current, neboli excitační postsynaptický proud) v průběhu repetitivní aplikace glutamátu, a to od počáteční 30 % inhibice až k 80 % inhibovaných synaptických NMDAR proudů (Wroge et al., 2012).

Jak tvrdí (Wroge et al., 2012), synaptické NMDA receptory mohou hrát také kritickou roli v neuronální smrti způsobené hypoxií, kdy jsou aktivovány zvýšenou koncentrací endogenního glutamátu. Jelikož se memantin ukázal být schopen inhibovat efektivně nejen nadměrně aktivované extrasynaptické, ale i synaptické NMDA receptory (pokud byly navozeny patologické podmínky), je tím pádem pravděpodobné, že pro schopnost memantinu efektivně zabránit buněčné smrti je důležitý spíše charakter, délka a frekvence prezentace agonisty NMDA receptorům a jejich následná aktivace, než samotná subcelulární lokalizace receptoru (Wild et al., 2013; Wroge et al., 2012).

4.2. Inhibiční steroidy

Neurosteroidy jsou látky steroidní struktury syntetizované lokálně v buňkách CNS a vyznačující se různorodými modulačními účinky jak na NMDAR, tak i na jiné druhy receptorů (Korinek et al., 2011). V současné době patří endogenní neurosteroidy a jejich syntetické analogy mezi hojně studované sloučeniny právě v souvislosti s negativní modulací NMDAR a jejich neuroprotektivními účinky před buněčnou excitotoxicitou a neuronální smrtí. Mezi tyto látky patří např. endogenní pregnanolon sulfát a jeho syntetické analogy pregnanolon hemisukcinát, pregnanolon glutamát a pregnanolon hemipimelát (Kleteckova, Tsenov, Kubova, Stuchlik, & Vales, 2014; Lapchak, 2004; Rambousek et al., 2011; Vyklicky et al., 2016; Weaver, Marek, Park-Chung, Tam, & Farb, 1997).



Obr. 6. Chemická struktura pregnanolon sulfátu. Upraveno a převzato z (Vyklicky et al., 2016)

Pregnanolon sulfát (3α5βS nebo 20-oxo-5β-pregnan-3α-yl sulfát) je nekompetitivním alosterickým inhibitorem NMDA receptorů (Obr. 6) (Park-Chung, Wu, & Farb, 1994). Řadí se stejně jako již zmíněný memantin a MK-801 mezi use-dependent inhibitory schopné navázat se na NMDA receptor pouze v aktivovaném stavu, ale oproti nim je jeho působení tzv. voltage-independent, tedy nezávislé na úrovni depolarizace neuronu (Petrovic, Sedlacek, Horak, Chodounska, & Vyklicky, 2005). Vazebné místo pro pregnanolon sulfát, neboli PA-S, se nejspíše nachází v extracelulárním vestibulu iontového kanálu NMDAR, k němuž má neurosteroid přístup pouze po konformačních změnách transmembránových domén NMDAR podjednotek, které nastanou po navázání agonisty na receptor (Vyklicky et al., 2015). Oproti blokátorům iontového kanálu NMDAR se pregnanolon sulfát navíc dokáže vázat nejen na aktivované otevřené NMDAR, ale i na NMDAR v dalších konformačních stavech, jako je agonistou aktivovaný receptor se zavřeným kanálem, nebo desenzitizovaný receptor (Kussius, Kaur, & Popescu, 2009; Petrovic et al., 2005; Vyklicky et al., 2015).

Spolu s memantinem sdílí pregnanolon sulfát podobnou úroveň selektivity inhibice tonické aktivity oproti fazické, synaptické aktivitě NMDAR (Petrovic et al., 2005; Vyklicky et al., 2016). Ve studii (Vyklicky et al., 2016) výsledky experimentů na potkaních hipokampálních neuronech ukázaly dokonce vyšší účinnost PA-S selektivně inhibovat tonicky aktivované NMDA receptory, než jakou vykazuje memantin. Pregnanolon sulfát o 100 μ M koncentraci inhiboval proudy evokované 300 μ M NMDA asi z 81 %, zatímco amplituda NMDAR složky EPSC se v přítomnosti PA-S se snížila asi o 51 % (Vyklicky et al., 2016). Jeden ze syntetických analogů PA-S, pregnanolon hemipimelát (PA-hPim) dokonce synaptickou aktivitu neinhiboval vůbec, a naopak se v jeho přítomnosti NMDAR složka EPSC mírně zvýšila (Vyklicky et al., 2016). Memantin zato inhiboval tonickou aktivitu NMDAR asi z 80 %, tedy srovnatelně s PA-S, ale synapticky aktivované proudy byly memantinem inhibovány asi z 67 %. Jak navíc uvádí (Emnett et al., 2013; Vyklicky et al., 2016), v přítomnosti memantinu se synaptická aktivita opakovaně stimulovaných receptorů postupně stále snižovala, až byla dosažena hodnota, kdy nebylo možné rozlišit selektivitu memantinu pro tonickou aktivitu oproti té synaptické. Tímto se memantin značně liší od PA-S, u něhož nebyla pozorována výrazná změna účinnosti inhibice fazické vs tonické aktivity NMDAR i po několikanásobných aplikacích agonisty (Vyklicky et al., 2016). Díky této vlastnosti, spolu s jeho napěťově nezávislou schopností inhibice představuje tento endogenní neurosteroid zajímavou sloučeninu s potenciálem zamezit neurotoxické smrti nastávající po nadměrné aktivaci NMDA receptorů (Vyklicky et al., 2016).

Přímý vliv PA-S na buněčnou excitotoxicitu a úmrtí neuronů je ještě předmětem zkoumání, ale jeho syntetické analogy se prokázaly být neuroprotektivní v modelech *in vitro* a *in vivo* (Rambousek et al., 2011; Weaver et al., 1997). Pregnanolon hemipimelát, který se v modelech *in vitro* vyznačuje ještě lepší selektivitou inhibice než PA-S, vykazuje v modelech *in vivo* neuroprotektivní vlastnosti, a zároveň u něj nebyly při behaviorálních testech pozorovány negativní vedlejší účinky (Vyklicky et al., 2016). V tomto ohledu může mít tedy v budoucnu PA-S a jeho analogy výhodu oproti memantinu, který je sice běžně považován za klinicky dobře tolerovanou látku, ale např. v některých *in vivo* modelech se při aplikaci memantinu vyskytly ve zvířatech hyperlokomoce a kognitivní deficity (Bubser, Keseberg, Notz, & Schmidt, 1992; Dix, Gilmour, Potts, Smith, & Tricklebank, 2010; Vyklicky et al., 2016), a jeho použití pro inhibici buněčné excitotoxicity a k léčbě neuropatologií z ní pramenících tedy nelze považovat za univerzální a zcela bez negativních aspektů.

4.3. Pozitivní modulátory aktivity NMDAR

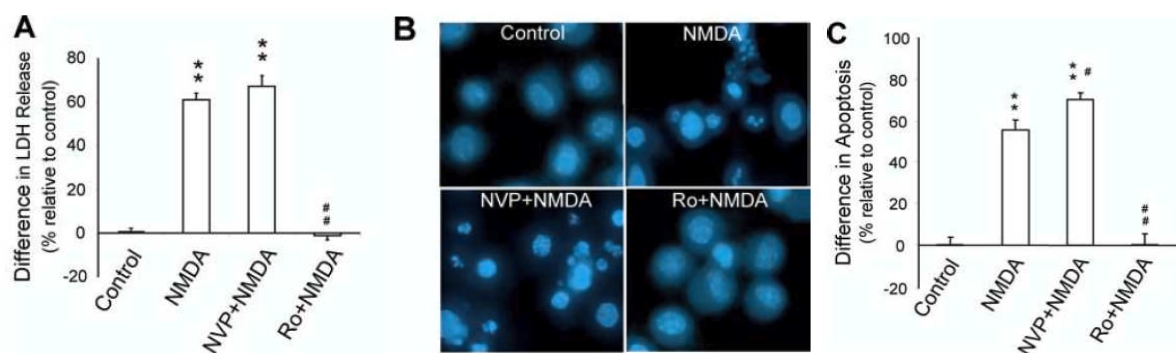
NMDA receptory jsou spojené s onemocněními CNS nejen z pohledu buněčné excitotoxicity, která nastává při jejich nadměrné aktivaci, ale také z pohledu jejich nedostatečné aktivity a dysfunkce. Je tedy důležité, aby byla věnována pozornost i pozitivním modulátorům NMDAR, které by byly terapeuticky využitelné právě v případě onemocnění provázejících sníženou funkci NMDAR, jako je např. schizofrenie (Balu, 2016). Mezi takovéto pozitivní modulátory NMDAR můžeme zařadit neurosteroid pregnenolon sulfát (PREG-S) (Wu, Gibbs, & Farb, 1991) či metabolit cholesterolu 24(S)-hydroxycholesterol (24(S)-HC), který se přirozeně vyskytuje v hojné míře v mozku (Paul et al., 2013).

24(S)-HC a jeho syntetické analogy SGE-201 a SGE-301 se ukázaly být účinnými PAM (pozitivní alosterický modulátor) NMDAR. 24(S)-HC potencoval NMDAR složku EPSCs (zkoumáno na potkaních hipokampálních neuronech) a dokázal zvrátit negativní účinky blokátoru iontového kanálu NMDAR ketaminu na synaptickou plasticitu (Paul et al., 2013). Jeho syntetické deriváty SGE-201 a SGE-301 navíc měly pozitivní účinky v *in vivo* modelech, kde dokázaly eliminovat behaviorální a kognitivní deficity vzniklé po aplikaci blokátorů NMDAR (Paul et al., 2013). Zároveň je však třeba poznamenat, že v další studii dokázal 24(S)-HC zhoršit neuronální smrt navozenou OGD, a v modelech buněčné excitotoxicity by tak mohla jeho schopnost potenciace NMDAR a abundantní přítomnost v CNS hrát spíše negativní roli (Sun, Taylor, Zorumski, & Mennerick, 2017). Pro studium excitotoxicity a toho, jak jí zabránit, se tedy zdá být relevantní nejen selektivní inhibice nadměrné aktivity NMDA receptorů, ale i zacílení syntézy pozitivních endogenních modulátorů NMDAR v CNS a její případná regulace.

5. Přístupy ke studiu NMDAR toxicity

Jak je v této práci popsáno, buněčná excitotoxicita je velmi komplexní problém a její přesné příčiny nejsou zatím jednoznačně známy. Existují různé názory jak na původ excitotoxicity NMDA receptorů, tak i na nejvhodnější způsoby, jak zacílit inhibici NMDAR, která by excitotoxicitě mohla co nejúčinněji zabránit bez nežádoucích vedlejších účinků.

Jedním z přístupů k neuronální toxicitě je ten, že její hlavní příčinou je aktivace NMDA receptorů obsahujících GluN2B podjednotky (Liu et al., 2007; Tu et al., 2010; Vieira et al., 2016). Ve studii (Liu et al., 2007) autoři ukázali, že aplikace GluN2B specifického inhibitoru Ro 25-6981 dokázala předejít neuronální nekróze a apoptóze indukované inkubací neuronů po dobu 20 min v médiu s 50 μ M NMDA a 10 μ M glycinem, zato GluN2A specifický antagonist NVP-AAM077 této nekrotické smrti a znakům postupující apoptózy zabránit nedokázal (Obr. 7) (Liu et al., 2007). Dále zde bylo ukázáno, že blokace GluN2B obsahujících receptorů eliminovala kaspázou 3 indukované signály spojované s apoptotickou smrtí neuronů, zatímco blokace GluN2A obsahujících NMDAR tyto signály dokonce mírně zvyšovala (Liu et al., 2007).

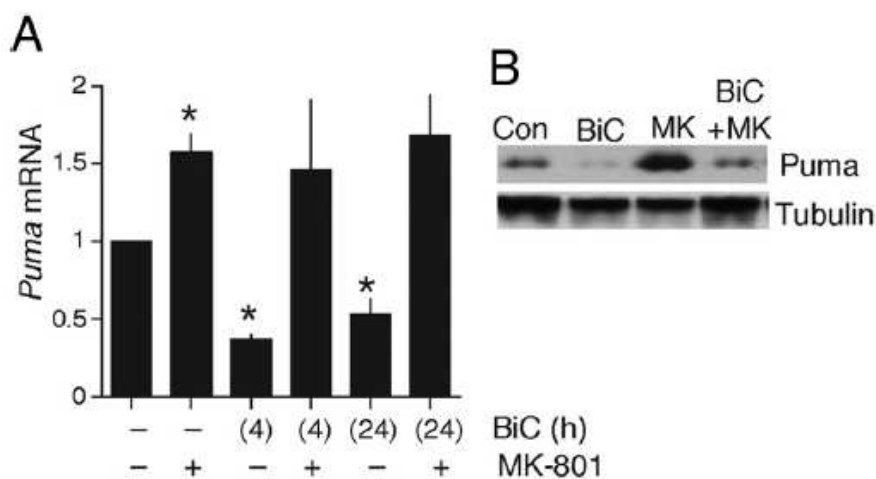


Obr. 7. GluN2B a GluN2A obsahující NMDAR mají rozdílné účinky na buněčnou smrt.

A) Aplikací GluN2B specifického antagonisty Ro-256981 (0,5 μ M) došlo ke snížení nekrotické smrti neuronů způsobené 50 μ M NMDA, aplikace GluN2A specifického antagonisty NVP-AAM077 (0,4 μ M) nekrotickou smrt ještě zhoršila. Smrt buněk kvantifikována měřením koncentrace LDH. B) NMDA způsobilo v neuronech kondenzaci a fragmentaci chromatinu (znaky apoptózy), které byly ještě zvýrazněny v přítomnosti NVP-AAM077, naopak Ro-256981 tyto znaky eliminoval. Fotografie pořízeny na fluorescenčním mikroskopu, buňky obarveny Hoechst-33342. C) Kvantifikace apoptotické smrti neuronů způsobené aplikací NMDA pomocí ELISA assay. Výsledky korespondují s účinky jednotlivých antagonistů na nekrotickou smrt. Upraveno a převzato z (Liu et al., 2007).

Tyto výsledky tedy naznačují, že aktivace GluN1-GluN2A receptorů indukuje tzv. pro-survival mechanismy, které hrají proti pro-apoptotickým účinkům GluN1-GluN2B NMDAR (Liu et al., 2007). Jak ovšem ve své práci tvrdí (Engelhardt et al., 2007), na buněčné excitotoxicitě se mohou podílet oba zmíněné subtypy receptorů a v průběhu jejich experimentů nedokázala inhibice pouze jednoho subtypu efektivně zabránit buněčné smrti. Navíc se podjednotkové složení NMDAR během vývoje neuronů proměňuje, a jak ukázali (Martel et al., 2009), aktivita GluN2B obsahujících receptorů je schopna iniciovat jak signály podporující buněčné přežití, tak i excitotoxické účinky vedoucí k buněčné smrti. Zdá se tedy být nepravděpodobné, že by buněčná excitotoxicita byla důsledkem nadměrné aktivace pouze určité podjednotkově specifické populace NMDAR.

Dalším z náhledů na problematiku excitotoxicity je ten, že se na ní podílejí primárně NMDAR nacházející se v extrasynaptických lokalitách, zatímco synaptické receptory podporují správnou fyziologickou funkci neuronů a jejich přežívání (Hardingham & Bading, 2010). Tuto hypotézu podporuje řada studií, mezi něž patří např. výsledky experimentů (Léveillé et al., 2010), které ukazují, že potenciace synaptické aktivity NMDAR dokázala omezit expresi pro-apoptotického genu *Puma*, zatímco blokáde spontánní synaptické aktivity NMDA receptorů pomocí MK-801 způsobila zvýšení exprese *Puma* a tím pádem i apoptotickou smrt neuronů (Obr. 8).



Obr. 8. Potlačení exprese pro-apoptotického genu *Puma* je závislé na synaptické aktivitě neuronů. A) Aplikace 4-AP (250 μ M) a bicucullinu (50 μ M) způsobila robustní synaptickou aktivitu NMDA receptorů, která dokázala potlačit expresi *Puma* mRNA. Když byly synaptické NMDAR zablokovány 10 μ M MK-801, k potlačení exprese *Puma* genu nedošlo. Výsledky analyzovány QRT-PCR přítomné *Puma* mRNA v kortikálních neuronech. B) Regulace exprese *Puma* proteinu způsobená synaptickou aktivitou NMDAR ilustrována pomocí western blotu. Převzato z (Léveillé et al., 2010).

V další studii (provedené na primárních kortikálních neuronech) bylo ukázáno, že specifická aktivace extrasynaptických NMDA receptorů, které bylo dosaženo pomocí předchozí blokace synaptických NMDAR 10 μ M MK-801 aktivovaných aplikací NMDA, měla za následek masivní influx Ca^{2+} iontů do neuronu vyúsťujícího ve ztrátu mitochondriálního membránového potenciálu, což je jedním z časných ukazatelů neuronální excitotoxicity (Léveillé et al., 2008). Naopak vtok Ca^{2+} pouze přes synaptické NMDAR neměl žádný signifikantní vliv na mitochondriální membránový potenciál, což by indikovalo specifickou asociaci extrasynaptických NMDAR s mitochondriální dysfunkcí a s ní spojenou buněčnou smrtí (Léveillé et al., 2008). Jak ale bylo již zmíněno v předchozích kapitolách, podle (Wroge et al., 2012) se i synaptické NMDA receptory mohou podílet na indukci neuronální smrti např. při hypoxických podmínkách a jejich blokací je možné docílit alespoň částečného snížení buněčné excitotoxicity. Jak ovšem poukazuje (Parsons & Raymond, 2014), v předchozí zmíněné studii bylo použito médium neobsahující Mg^{2+} ionty představující nefyziologické podmínky, což v kombinaci s hypoxickým inzultem mohlo způsobit úroveň tonické aktivace synaptických NMDAR, kterou by nebylo normálně možné pozorovat za fyziologické přítomnosti Mg^{2+} . Extrasynaptické NMDA receptory tak mohou hrát důležitou roli v buněčné excitotoxicitě, ale subcelulární lokalizace NMDAR pravděpodobně není jediným faktorem, který excitotoxicitu ovlivňuje.

V neposlední řadě je v mnohých studiích považována za hlavní příčinu excitotoxicity NMDAR jejich tonická aktivace oproti fázické aktivaci. Pro tuto hypotézu hovoří výsledky experimentů sledujících např. selektivitu inhibice NMDAR pomocí blokátoru jejich iontového kanálu memantinu či inhibičního neurosteroidu PA-S. Jak bylo ukázáno v práci (Wroge et al., 2012), memantin o klinicky relevantní koncentraci dokázal zabránit buněčné smrti způsobené jak extrasynaptickými, tak synaptickými NMDAR, které byly aktivovány identickým způsobem, a to pokud byl agonista NMDAR aplikován opakovaně či ustáleně po delší časový úsek. V práci (Vyklícky et al., 2016) výsledky experimentů přisuzují pregnanolon sulfátu jeho neuroprotektivní vlastnosti také na základě selektivní inhibice tonické aktivity oproti fyziologické synaptické aktivitě NMDAR. Vzhledem tedy k velice širokému spektru výsledků experimentů poukazujících na různé příčiny, které mohou stát za neuronální excitotoxicitou je dost možné, že jednotlivé výše zmíněné hypotézy se navzájem kompletně nevylučují, ale v některých ohledech se mohou spíše doplňovat.

6. Závěr

Aktivita NMDA receptorů je nedílnou součástí správné fyziologické funkce mozku. Ať už jejich hypofunkce či naopak nadměrná aktivita vede k různým patofyziologickým stavům a neurodegenerativním onemocněním. Okolnosti, za kterých k buněčné excitotoxicitě provázející excesivní aktivaci NMDAR dochází a které subpopulace receptorů se na ní nejvíce podílejí však stále zůstává předmětem debat a zkoumání. Je tedy v našem zájmu plně porozumět mechanismům jejich aktivace a účinkům jednotlivých NMDAR modulátorů, které by těmito patologiím mohly zabránit.

Selektivní inhibitory NMDA receptorů se prokázaly jako účinné potenciální terapeutické látky v léčbě onemocnění spojených s buněčnou excitotoxicitou. V *in vitro* modelech dosahují konkrétně např. memantin či inhibiční neurosteroid PA-S a jeho analogy dobrých výsledků v blokování nežádoucí tonické aktivity NMDAR se současným zachováním jejich důležité bazální synaptické aktivity. Také v *in vivo* modelech jejich aplikace s sebou většinou nenese negativní vedlejší účinky pozorované u jiných NMDAR inhibitorů, jako je MK-801 nebo ketamin. PA-S díky svým klinicky zajímavým vlastnostem, kterými jsou use-dependent navazování, use-independent odvazování a napěťově nezávislé působení, vykazuje oproti memantinu ještě účinnější selektivní inhibici patologické tonické aktivace NMDAR. Je však třeba poznamenat, že zkoumané negativní modulátory NMDAR vykazují různé účinky na ostatní druhy receptorů přítomných v CNS, a při hledání a studiu nových terapeuticky využitelných látek je tak důležité dívat se na jejich působení v širším kontextu.

Seznam literatury

Sekundární citace označeny *

Akazawa, C., Shigemoto, R., Bessho, Y., Nakanishi, S., & Mizuno, N. (1994). Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *Journal of Comparative Neurology*, 347(1), 150–160.

Anis, N. A., Berry, S. C., Burton, N. R., & Lodge, D. (1983). The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. *British Journal of Pharmacology*, 79(2), 565–575.

*Balu, D. T. (2016). The NMDA Receptor and Schizophrenia: From Pathophysiology to Treatment. *Advances in Pharmacology*, 76, 351–382.

*Banerjee, A., Larsen, R. S., Philpot, B. D., & Paulsen, O. (2016). Roles of presynaptic NMDA receptors in neurotransmission and plasticity. *Trends in Neurosciences*, 39(1), 26–39.

Berkel, S., Marshall, C. R., Weiss, B., Howe, J., Roeth, R., Moog, U., ... Rappold, G. A. (2010). Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nature Genetics*, 42(6), 489–491.

Berretta, N., & Jones, R. S. G. (1996). Tonic facilitation of glutamate release by presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the entorhinal cortex. *Neuroscience*, 75(2), 339–344.

Bettini, E., Sava, A., Griffante, C., Carignani, C., Buson, A., Capelli, A. M., ... Cardullo, F. (2010). Identification and Characterization of Novel NMDA Receptor Antagonists Selective for NR2A- over NR2B-Containing Receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 335(3), 636–644.

Bubser, M., Keseberg, U., Notz, P. K., & Schmidt, W. J. (1992). Differential behavioural and neurochemical effects of competitive and non-competitive NMDA receptor antagonists in rats. *European Journal of Pharmacology*, 229(1), 75–82.

Buchan, A., Li, H., & Pulsinelli, W. A. (1991). The N-methyl-D-aspartate Antagonist, MK-80 1, Fails to Protect against Neuronal Damage Caused by Transient, Severe Forebrain Ischemia in Adult Rats. *The Journal of Neuroscience*, 11(4), 1049–1056.

Chatterton, J. E., Awobuluyi, M., Premkumar, L. S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., ... Zhang, D. (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature*, 415(6873), 793–798.

Chen, H. S., & Lipton, S. A. (1997). Mechanism of memantine block of NMDA-activated channels in rat retinal ganglion cells: uncompetitive antagonism. *The Journal of Physiology*, 499(Pt 1), 27–46.

Chen, H. S., Pellegrini, J. W., Aggarwal, S. K., Lei, S. Z., Warach, S., Jensen, F. E., & Lipton, S. A. (1992). Open-channel Block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) Responses by Memantine: Therapeutic Advantage against NMDA Receptor-mediated Neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience*, 12(11), 4427–4436.

Choi, D. W. (1987). Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience*, 7(2), 369–379.

Choi, D. W., Koh, J. Y., & Peters, S. (1988). Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *The Journal of Neuroscience*, 8(1), 185–196.

Clements, J. D., Lester, R. A. J., Tong, G., Jahr, C. E., & Westbrook, G. L. (1992). The Time Course of Glutamate in the Synaptic Cleft The Time Course of Glutamate in the Synaptic Cleft. *Science*, 258(5087),

1498–1501.

Dix, S., Gilmour, G., Potts, S., Smith, J. W., & Tricklebank, M. (2010). A within-subject cognitive battery in the rat : differential effects of NMDA receptor antagonists. *Psychopharmacology*, 212(2), 227–242.

Durand, G. M., Gregor, P., Zheng, X., Bennett, M. V., Uhl, G. R., & Zukin, R. S. (2006). Cloning of an apparent splice variant of the rat N-methyl-D-aspartate receptor NMDAR1 with altered sensitivity to polyamines and activators of protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(19), 9359–9363.

Emnett, C. M., Eisenman, L. N., Taylor, A. M., Izumi, Y., Zorumski, C. F., & Mennerick, S. (2013). Indistinguishable Synaptic Pharmacodynamics of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Channel Blockers Memantine and Ketamine. *Molecular Pharmacology*, 84(6), 935–947.

Endele, S., Rosenberger, G., Geider, K., Popp, B., Tamer, C., Stefanova, I., ... Kutsche, K. (2010). Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. *Nature Genetics*, 42(11), 1021–1026.

Engelhardt, J. V., Coserea, I., Pawlak, V., Fuchs, E. C., Köhr, G., Seeburg, P. H., & Monyer, H. (2007). Excitotoxicity in vitro by NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors. *Neuropharmacology*, 53(1), 10–17.

Fadda, E., Danysz, W., Wroblewski, J. T., & Costa, E. (1988). Glycine and D-serine increase the affinity of N-methyl-D-aspartate sensitive glutamate binding sites in rat brain synaptic membranes. *Neuropharmacology*, 27(11), 1183–1185.

Fischer, G., Mutel, V., Trube, G., Malherbe, P., Kew, J. N. C., Mohacsi, E., ... Kemp, J. A. (1997). Ro 25–6981, a Highly Potent and Selective Blocker of N-Methyl-D-Aspartate Receptors Containing the NR2B Subunit. Characterization in Vitro. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 283(3), 1285–1292.

Fleidervish, I. A., Gebhardt, C., Astman, N., Gutnick, M. J., & Heinemann, U. (2001). Enhanced Spontaneous Transmitter Release Is the Earliest Consequence of Neocortical Hypoxia That Can Explain the Disruption of Normal Circuit Function. *The Journal of Neuroscience*, 21(13), 4600–4608.

Foster, A. C., Gill, R., Kemp, J. A., & Woodruff, G. N. (1987). Systemic administration of MK-801 prevents N-methyl-d-aspartate-induced neuronal degeneration in rat brain. *Neuroscience Letters*, 76(3), 307–311.

Foster, A. C., Gill, R., & Woodruff, G. N. (1988). Neuroprotective Effects of MK-801 in vivo: Selectivity and Evidence for Delayed Degeneration Mediated by NMDA Receptor Activation. *The Journal of Neuroscience*, 8(12), 4745–4754.

Gao, X. M., Sakai, K., Roberts, R. C., Conley, R. R., Dean, B., & Tamminga, C. A. (2000). Ionotropic Glutamate Receptors and Expression of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunits in Subregions of Human Hippocampus: Effects of Schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, 157(7), 1141–1149.

Gilmour, G., Pioli, E. Y., Dix, S. L., Smith, J. W., Conway, M. W., Jones, W. T., ... Tricklebank, M. D. (2009). Diverse and often opposite behavioural effects of NMDA receptor antagonists in rats : implications for “NMDA antagonist modelling” of schizophrenia. *Psychopharmacology*, 205(2), 203–216.

Goldberg, M. P., & Choi, D. W. (1993). Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *The Journal of Neuroscience*, 13(8), 3510–3524.

Halliwell, R. F., Peters, J. A., & Lambert, J. J. (1989). The mechanism of action and pharmacological specificity of the anticonvulsant NMDA antagonist MK-801: a voltage clamp study on neuronal cells in culture. *British Journal of Pharmacology*, 96(2), 480–494.

- *Hansen, K. B., Yi, F., Perszyk, R. E., Furukawa, H., Wollmuth, L. P., Gibb, A. J., & Traynelis, S. F. (2018). Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *Journal of General Physiology*, 150(8),
- *Hardingham, G. E., & Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: Implications for neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(10), 682–696.
- Hardingham, G. E., Fukunaga, Y., & Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature Neuroscience*, 5(5), 405–414.
- *Henson, M. A., Roberts, A. C., Pérez-Otaño, I., & Philpot, B. D. (2010). Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Progress in Neurobiology*, 91(1), 23–37.
- Hestrin, S., Nicoll, R. A., Perkel, D. J., & Sah, P. (1990). Analysis of excitatory synaptic action in pyramidal cells using whole-cell recording from rat hippocampal slices. *Journal of Physiology*, 422, 203–225.
- Huettner, J. E., & Bean, B. P. (1988). Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: Selective binding to open channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(4), 1307–1311.
- Ibrahim, H. M., Hogg, A. J., Healy, D. J., Haroutunian, V., Davis, K. L., & Meador-Woodruff, J. H. (2000). Ionotropic Glutamate Receptor Binding and Subunit mRNA Expression in Thalamic Nuclei in Schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, 157(11), 1811–1823.
- Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., ... Olney, J. W. (1999). Blockade of NMDA Receptors and Apoptotic Neurodegeneration in the Developing Brain. *Science*, 283(5398), 70–74.
- Ishii, T., Moryoshi, K., Sugihara, H., Sakurada, K., Kadotani, H., Yokoi, M., ... Nakanishi, S. (1993). Molecular Characterization of the Family of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunits. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(4), 2836–2843.
- Ivanovic, A., Reiländer, H., Laube, B., & Kuhse, J. (1998). Expression and Initial Characterization of a Soluble Glycine Binding Domain of the N -Methyl- D -aspartate Receptor NR1 Subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(32), 19933–19937.
- Jabaudon, D., Scanziani, M., Gähwiler, B. H., & Gerber, U. (2000). Acute decrease in net glutamate uptake during energy deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(10), 5610–5615.
- Javitt, D. C., & Zukin, S. R. (1991). Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, 148(10), 1301–1308.
- Johnson, J. W., & Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, 325(6104), 529–531.
- Kleteckova, L., Tsenov, G., Kubova, H., Stuchlik, A., & Vales, K. (2014). Neuroprotective effect of the 3 α 5 β -pregnanolone glutamate treatment in the model of focal cerebral ischemia in immature rats. *Neuroscience Letters*, 564, 11–15.
- Koek, W., Woods, J. H., & Winger, G. D. (1988). MK-801, A Proposed Noncompetitive Antagonist of Excitatory Amino Acid Neurotransmission Produces Phencyclidine-Like Behavioral Effects in Pigeons, Rats and Rhesus Monkeys. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 245(3), 969–974.
- Koh, J. Y., & Choi, D. W. (1987). Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *Journal of Neuroscience Methods*, 20(1), 83–90.
- *Korinek, M., Kapras, V., Vyklicky, V., Adamusova, E., Borovska, J., Vales, K., ... Vyklicky, L. (2011). Neurosteroid modulation of N-methyl-D-aspartate receptors: Molecular mechanism and behavioral

effects. *Steroids*, 76(13), 1409–1418.

Krystal, J. H., Karper, L. P., Seibyl, J. P., Freeman, G. K., Delaney, R., Bremner, J., ... Charney, D. S. (1994). Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans: Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Archives of general psychiatry*, 51, 199–214.

Kuryatov, A., Laube, B., Betz, H., & Kuhse, J. (1994). Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: Structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron*, 12(6), 1291–1300.

Kussius, C. L., Kaur, N., & Popescu, G. K. (2009). Pregnanolone sulfate promotes desensitization of activated NMDA receptors. *Journal of Neuroscience*, 29(21), 6819–6827.

Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., ... Mishina, M. (1992). Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature*, 358(6381), 36–41.

Lapchak, P. A. (2004). The neuroactive steroid 3- α -ol-5- β -pregnan-20-one hemisuccinate, a selective NMDA receptor antagonist improves behavioral performance following spinal cord ischemia. *Brain Research*, 997(2), 152–158.

Laube, B., Hirai, H., Sturgess, M., Betz, H., & Kuhse, J. (1997). Molecular Determinants of Agonist Discrimination by NMDA Receptor Subunits: Analysis of the Glutamate Binding Site on the NR2B Subunit. *Neuron*, 18(3), 493–503.

Laube, B., Kuhse, J., & Betz, H. (1998). Evidence for a Tetrameric Structure of Recombinant NMDA Receptors. *The Journal of Neuroscience*, 18(8), 2954–2961.

Léveillé, F., El gaamouch, F., Gouix, E., Lecocq, M., Lobner, D., Nicole, O., & Buisson, A. (2008). Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *The FASEB Journal*, 22(12), 4258–4271.

Léveillé, F., Papadia, S., Fricker, M., Bell, K. F. S., Soriano, F. X., Martel, M. A., ... Hardingham, G. E. (2010). Suppression of the Intrinsic Apoptosis Pathway by Synaptic Activity. *The Journal of Neuroscience*, 30(7), 2623–2635.

*Lipton, S. A. (2004). Failures and Successes of NMDA Receptor Antagonists: Molecular Basis for the Use of Open-Channel Blockers like Memantine in the Treatment of Acute and Chronic Neurologic Insults. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 1(1), 101–110.

Liu, Y., Wong, T. P., Aarts, M., Rooyackers, A., Liu, L., Lai, T. W., ... Wang, Y. T. (2007). NMDA Receptor Subunits Have Differential Roles in Mediating Excitotoxic Neuronal Death Both In Vitro and In Vivo. *The Journal of Neuroscience*, 27(11), 2846–2857.

MacDermott, A. B., Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Smith, S. J., & Barker, J. L. (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature*, 321(6069), 519–522.

MacDonald, J. F., Bartlett, M. C., Mody, I., Pahapill, P., Reynolds, J. N., Salter, M. W., ... Pennefather, P. S. (1991). Actions of ketamine, phencyclidine and MK-801 on NMDA receptor currents in cultured mouse hippocampal neurones. *The Journal of Physiology*, 432, 483–508.

Martel, M. A., Wyllie, D. J. A., & Hardingham, G. E. (2009). In developing hippocampal neurons, NR2B-containing NMDA receptors can mediate signalling to neuronal survival and synaptic potentiation, as well as neuronal death. *Neuroscience*, 158(1), 334–343.

McDonald, J. W., Silverstein, F. S., & Johnston, M. V. (1987). MK-801 protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic damage. *European Journal of Pharmacology*, 140(3), 359–361.

McKay, S., Bengtson, C. P., Bading, H., Wyllie, D. J. A., & Hardingham, G. E. (2013). Recovery of

NMDA receptor currents from MK-801 blockade is accelerated by Mg^{2+} and memantine under conditions of agonist exposure. *Neuropharmacology*, 74, 119–125.

Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B., & Seeburg, P. H. (1994). Developmental and Regional Expression in the Rat Brain and Functional Properties of Four NMDA Receptors. *Neuron*, 12(3), 529–540.

Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., ... Seeburg, P. H. (1992). Heteromeric NMDA Receptors: Molecular and Functional Distinction of Subtypes. *Science*, 256(5060), 1217–1221.

Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., & Nakanishi, S. (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*, 354(6348), 31–37.

Nishi, M., Hinds, H., Lu, H. P., Kawata, M., & Hayashi, Y. (2001). Motoneuron-Specific Expression of NR3B, a Novel NMDA-Type Glutamate Receptor Subunit That Works in a Dominant-Negative Manner. *The Journal of Neuroscience*, 21(23), 1–6.

Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., & Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, 307(5950), 462–465.

*Olivares, D., Deshpande, V. K., Shi, Y., Debomoy, K. L., Greig, N. H., Rogers, J. T., & Huang, X. (2012). N-Methyl D-Aspartate (NMDA) Receptor Antagonists and Memantine Treatment for Alzheimer's Disease, Vascular Dementia and Parkinson's Disease. *Current Alzheimer Research*, 9(6), 746–758.

Olney, J. W. (1969). Brain Lesions, Obesity, and Other Disturbances in Mice Treated with Monosodium Glutamate. *Science*, 164(3880), 719–721.

Olney, John W., Labruyere, J., & Price, M. T. (1989). Pathological Changes Induced in Cerebrocortical Neurons by Phencyclidine and Related Drugs treatment. *Science*, 244(10), 1987–1990.

*Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Science*, 340(6), 383–400.

Papadia, S., Soriano, F. X., Léveillé, F., Martel, M. A., Dakin, K. A., Hansen, H. H., ... Hardingham, G. E. (2008). Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nature Neuroscience*, 11(4), 476–487.

Park-Chung, M., Wu, F. S., & Farb, D. H. (1994). 3 alpha-Hydroxy-5 beta-pregnan-20-one sulfate: a negative modulator of the NMDA-induced current in cultured neurons. *Molecular Pharmacology*, 46(1), 146–150.

*Parsons, M. P., & Raymond, L. A. (2014). Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. *Neuron*, 82(2), 279–293.

Paul, S. M., Doherty, J. J., Robichaud, A. J., Belfort, G. M., Chow, B. Y., Hammond, R. S., ... Zorumski, C. F. (2013). The Major Brain Cholesterol Metabolite 24(S)-Hydroxycholesterol Is a Potent Allosteric Modulator of N-Methyl-D-Aspartate Receptors. *The Journal of Neuroscience*, 33(44), 17290–17300.

Petrovic, M., Sedlacek, M., Horak, M., Chodounska, H., & Vyklicky, L. J. (2005). 20-Oxo-5 β -Pregnan-3 α -yl Sulfate Is a Use-Dependent NMDA Receptor Inhibitor. *The Journal of Neuroscience*, 25(37), 8439–8450.

Rambousek, L., Bubenikova-Valesova, V., Kacer, P., Syslova, K., Kenney, J., Holubova, K., ... Vales, K. (2011). Cellular and behavioural effects of a new steroidal inhibitor of the N-methyl-D-aspartate receptor 3 α 5 β -pregnanolone glutamate. *Neuropharmacology*, 61(1–2), 61–68.

Rauner, C., & Köhr, G. (2011). Triheteromeric NR1/NR2A/NR2B Receptors Constitute the Major N-Methyl-D-aspartate Receptor Population in Adult Hippocampal Synapses. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(9), 7558–7566.

- Rego, A. C., & Oliveira, C. R. (2003). Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: Implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochemical Research*, 28(10), 1563–1574.
- Rossi, D. J., Oshima, T., & Attwell, D. (2000). Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*, 403(6767), 316–321.
- Rothman, S. M., & Olney, J. W. (1986). Glutamate and the pathophysiology of hypoxic–ischemic brain damage. *Annals of Neurology*, 19(2), 105–111.
- Sato, K., Morimoto, K., & Okamoto, M. (1988). Anticonvulsant action of a non-competitive antagonist of NMDA receptors (MK-801) in the kindling model of epilepsy. *Brain Research*, 463(1), 12–20.
- Shimamoto, K., Sakai, R., Takaoka, K., Yumoto, N., Nakajima, T., Amara, S. G., & Shigeri, Y. (2004). Characterization of Novel L-threo- β -Benzyloxyaspartate Derivatives, Potent Blockers of the Glutamate Transporters. *Molecular Pharmacology*, 65(4), 1008–1015.
- Steigerwald, F., Schulz, T. W., Schenker, L. T., Kennedy, M. B., Seeburg, P. H., & Köhr, G. (2000). C-Terminal Truncation of NR2A Subunits Impairs Synaptic But Not Extrasynaptic Localization of NMDA Receptors. *The Journal of Neuroscience*, 20(12), 4573–4581.
- Stocca, G., & Vicini, S. (1998). Increased contribution of NR2A subunit to synaptic NMDA receptors in developing rat cortical neurons. *Journal of Physiology*, 507(Pt 1), 13–24.
- Sugihara, H., Moriyoshi, K., Ishii, T., Masu, M., & Nakanishi, S. (1992). Structures and properties of seven isoforms of the NMDA receptor generated by alternative splicing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 185(3), 826–832.
- Sun, M. Y., Taylor, A., Zorumski, C. F., & Mennerick, S. (2017). 24S-hydroxycholesterol and 25-hydroxycholesterol differentially impact hippocampal neuronal survival following oxygen-glucose deprivation. *PLoS ONE*, 12(3), 1–13.
- Tovar, K. R., & Westbrook, G. L. (1999). The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *The Journal of Neuroscience*, 19(10), 4180–4188.
- *Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., ... Dingledine, R. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews*, 62(3), 405–496.
- Tu, W., Xu, X., Peng, L., Zhong, X., Zhang, W., Mangala, M. S., ... Lu, Y. (2010). DAPK1 Interaction with NMDA Receptor NR2B Subunits Mediates Brain Damage in Stroke. *Cell*, 140(2), 222–234.
- Ulbrich, M. H., & Isacoff, E. Y. (2008). Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(37), 14163–14168.
- Vieira, M. M., Schmidt, J., Ferreira, J. S., She, K., Oku, S., Mele, M., ... Carvalho, A. L. (2016). Neurobiology of Disease Multiple domains in the C-terminus of NMDA receptor GluN2B subunit contribute to neuronal death following in vitro ischemia. *Neurobiology of Disease*, 89, 223–234.
- *Vyklícky, V., Korinek, M., Smejkalová, T., Balik, A., Krausová, B., Kaniakova, M., ... Vyklícky, L. (2014). Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiological Research*, 63(Suppl. 1), 191–203.
- Vyklícky, V., Krausová, B., Cerný, J., Balik, A., Zapotočský, M., Novotný, M., ... Vyklícky, L. (2015). Block of NMDA receptor channels by endogenous neurosteroids: implications for the agonist induced conformational states of the channel vestibule. *Scientific Reports*, 5, 10935.
- Vyklícky, V., Smejkalová, T., Krausová, B., Balik, A., Korinek, M., Borovská, J., ... Vyklícky, L. (2016). Preferential Inhibition of Tonically over Phasically Activated NMDA Receptors by Pregnane Derivatives. *The Journal of Neuroscience*, 36(7), 2161–2175.

- Wafford, K. A., Kathoria, M., Bain, C. J., Marshall, G., Le Bourdellès, B., Kemp, J. A., & Whiting, P. J. (1995). Identification of Amino Acids in the N-Methyl-D-aspartate Receptor NR1 Subunit that Contribute to the Glycine Binding Site. *Molecular Pharmacology*, 47(2), 374–380.
- Wang, R., & Reddy, P. H. (2017). Role of glutamate and NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(4), 1041–1048.
- Weaver, C. E. J., Marek, P., Park-Chung, M., Tam, S. W., & Farb, D. H. (1997). Neuroprotective activity of a new class of steroidal inhibitors of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(19), 10450–10454.
- Wild, A. R., Akyol, E., Brothwell, S. L. C., Kimkool, P., Skepper, J. N., Gibb, A. J., & Jones, S. (2013). Memantine block depends on agonist presentation at the NMDA receptor in substantia nigra pars compacta dopamine neurones. *Neuropharmacology*, 73, 138–146.
- Williams, K. (2001). Ifenprodil, a Novel NMDA Receptor Antagonist : Site and Mechanism of Action. *Current Drug Targets*, 2(3), 285–298.
- Wolosker, H. (2007). NMDA Receptor Regulation by D-serine: New Findings and Perspectives. *Molecular Neurobiology*, 36(2), 152–164.
- Wong, E. H. F., Kemp, J. A., Priestley, T., Knight, A. R., Woodruff, G. N., & Iversen, L. L. (1986). The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(18), 7104–7108.
- Wong, H., Liu, X., Matos, M. F., Chan, S. F. A. I., Lipton, S. A., & Sucher, N. J. (2002). Temporal and Regional Expression of NMDA Receptor Subunit NR3A in the Mammalian Brain. *Journal of Comparative Neurology*, 450(4), 303–317.
- Wroge, C. M., Hogins, J., Eisenman, L., & Mennerick, S. (2012). Synaptic NMDA Receptors Mediate Hypoxic Excitotoxic Death. *The Journal of Neuroscience*, 32(19), 6732–6742.
- Wu, F. S., Gibbs, T. T., & Farb, D. H. (1991). Pregnenolone Sulfate: A Positive Allosteric at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Molecular Pharmacology*, 40(3), 333–336.
- Xia, P., Chen, H. S. V., Zhang, D., & Lipton, S. A. (2010). Memantine Preferentially Blocks Extrasynaptic Over Synaptic NMDA Receptor Currents in Hippocampal Autapses. *Journal of Neuroscience*, 30(33), 11246–11250.
- Yao, Y., Harrison, C. B., Freddolino, P. L., Schulten, K., & Mayer, M. L. (2008). Molecular mechanism of ligand recognition by NR3 subtype glutamate receptors. *The EMBO Journal*, 27(15), 2158–2170.
- Yao, Y., & Mayer, M. L. (2006). Characterization of a Soluble Ligand Binding Domain of the NMDA Receptor Regulatory Subunit NR3A. *The Journal of Neuroscience*, 26(17), 4559–4566.
- Zhu, S., Stein, R. A., Yoshioka, C., Lee, C. H., Goehring, A., Mchaourab, H. S., & Gouaux, E. (2016). Mechanism of NMDA receptor inhibition and activation. *Cell*, 165(3), 704–714.